

Bakalářská práce

Využití kapilární elektroforézy v rámci forenzních molekulárně genetických zkoumání

Application of Capillary Electrophoresis in Forensic Molecular Genetic
Investigation



ANNA GRAFNETTEROVÁ

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

KATEDRA ANTROPOLOGIE A GENETIKY ČLOVĚKA

Praha, září 2010

Vedoucí práce: Mgr. Klára Doubková

Poděkování:

Děkuji paní Mgr. Kláře Doubkové za cenné rady, připomínky a odborné vedení během mé bakalářské práce. Déle děkuji rodině a blízkým přátelům za podporu při vypracovávání práce.

Prohášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím uvedených pramenů a literatury.

1	Úvod ke kapilární elektroforéze	6
1.1	Přístrojové vybavení pro kapilární elektroforézu	6
1.2	Fluorescenční barvení, fluorescenční barvy	7
1.3	Detekce fluorescence, matrice	9
1.4	Fragmentační analýza	9
1.5	Sekvenační analýza.....	10
2	Využití kapilární elektroforézy	11
2.1	Analýza DNA ve forenzní praxi	11
2.1.1	<i>Analýza mitochondriální DNA.....</i>	<i>12</i>
2.1.2	<i>Analýza STR na Y-chromozómu.....</i>	<i>13</i>
2.1.3	<i>Využití analýzy DNA u zvířat</i>	<i>14</i>
2.2	Využití kapilární elektroforézy v medicíně	14
3	STR analýza ve forenzní praxi.....	15
3.1	STR a STR oblasti	15
3.2	Komerčně dostupné kity pro STR analýzu	16
3.2.1	<i>Příklady komerčních kitů firmy Applied biosystems pro STR analýzu využívaných ve forenzní praxi.....</i>	<i>18</i>
3.2.2	<i>Příklady komerčních kitů firmy Promega pro STR analýzu využívaných ve forenzní praxi.....</i>	<i>20</i>
4	Hodnocení elektroforetogramů (primárních dat).....	22
4.1	Příklad komerčně dostupných softwarů pro analýzu dat získaných kapilární elektroforézou.....	22
5	DNA profil a jeho hodnocení	24
5.1	Nespecifické artefakty	24
5.2	Stutter píky	25
5.3	Pull-up píky (Bleedtrough) a spikes	26
5.4	Alelický drop-out („null“ alleles, „silent“ alleles).....	27
6	Závěr	27
7	Seznam zkratk	29
8	Použitá literatura	30

Abstrakt

Kapilární elektroforéza (CE) je metoda založená na principech tradiční deskové elektroforézy. Díky moderním způsobům fluorescenčního značení a jeho detekce, dosahuje vyšší spolehlivosti analýzy a přesnějších výsledků. Tato metoda je využitelná v mnoha oborech, kde dokonce může nahradit doposud používané metody jako je např. vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Důležité využití CE je ve forenzním zkoumání, kde se jedná především o identifikaci jedince na základě analýzy DNA i z velmi malého množství materiálu. Tím se zabývá tzv. STR analýza, která pro své účely využívá krátké tandemové repetice (STR) vykazující vysokou variabilitu v populaci. K získání správných dat je důležité odpovídající vybavení, přístroje, softwary, kity, na jejichž vývoji se podílejí i komerční firmy jako je Promega Corporation a Applied Biosystems. Celá analýza vede k získání DNA profilu a jeho vyhodnocení na základě shody vzorků získaných na místě činu a kontrolních (srovnávacích) vzorků. STR analýzu lze využít kromě lidské DNA i u zvířecí DNA zejména v chovu koní, skotu apod., kde napomáhá určení původu jedince a výběru jedince s nejlepšími znaky.

Klíčová slova:

kapilární elektroforéza • fluorescenční značení • STR • STR analýza • DNA profil

Abstract

The capillary electrophoresis (CE) is an analytical method based on the principle of the traditional plate electrophoresis. Modern ways of fluorescence marking and the detection result in the higher reliability of analyses as well as in more precise results. The utilization of this method is wide within a lot of science fields. In special cases this method can even replace methods used so far, i.e. HPLC. The CE is mainly used in the forensic investigation in particular for person identification based on the DNA analysis of the even minimal sample amount. The STR analysis is an example of such examination. It uses short tandem repeats with high variability within the population. Commercial companies e.g. Promega Corporation, Applied Biosystems etc., develop corresponding instrumentation, software and kits which are important for receiving correct data.

As a final result it is obtained DNA profile evaluated by comparison of samples from the “crime scene” with the reference samples.

Besides the using in the human domain the DNA profiles are often used in the veterinary practice, in animal (cats, dogs, horses, cattle etc.) raising or breeding, for improving the particular characteristics.

Key words:

capillary electrophoresis • fluorescent labeling • STR • STR analysis • DNA profil

1 Úvod ke kapilární elektroforéze

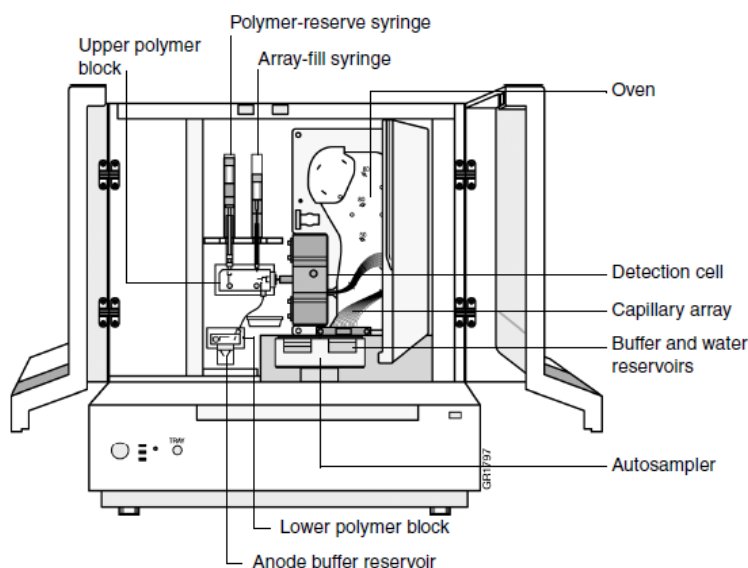
Kapilární elektroforéza (CE) je metoda, která se objevila v 80. letech 20. století jako vylepšení klasické deskové elektroforézy. CE pracuje na stejném principu, využívá pohybu nabitých částic v elektrickém poli v kapiláře naplněné nosným médiem, kterým je například vodný elektrolyt nebo specifický gel. Gel funguje nejen jako nosné medium, ale také jako molekulární síto, které rozděluje nabitě částice podle jejich molekulové hmotnosti (velikosti). Tato metoda může být úspěšně použita k separaci iontových, hydrofilních a lipofilních sloučenin, včetně anorganických a organických iontů, drog, aminokyselin, biologických aminů, nukleových kyselina a biopolymerů. To dává metodě možnosti využití v mnoha oborech, mezi které patří nejen DNA analýza a mapování lidského genomu, ale také analýza drog, farmacie, klinická a forenzní farmakologie a toxikologie. V neposlední řadě mezi tyto obory patří forenzně genetické zkoumání, kde se CE využívá k určování příbuzenských vztahů a k identifikaci jedince z různých typů biologického materiálu zajištěného na místě činu, často i ve velmi malém množství. Díky tomu se v posledních letech čím dál tím častěji využívá pro účely kriminalistiky. Výhodou metody je její schopnost snížit dobu analýzy a také nižší náročnost na spotřebu pufrů a dalších materiálů. Proto je tato metoda i levnější než starší metody.

1.1 Přístrojové vybavení pro kapilární elektroforézu

Pro analýzu vzorků kapilární elektroforézou je na trhu dostupných několik typů přístrojů firmy Applied Biosystems, která je hlavním dodavatelem přístrojů pro většinu laboratoří ve světě. Jedná se o genetické analyzátoři, které provádějí jak fragmentační tak sekvenační analýzu. Spolu s neustálým vývojem metody se vyvíjejí i nové přístroje. Zlepšuje se jejich ovladatelnost, přesnost a postupně se zvyšuje i jejich kapacita, která se odvíjí především od počtu kapilár v přístroji. Jeden z prvních přístrojů pro CE ABI PRISM 310 zahrnuje pouze jednu kapiláru, a i když jsou dnes dostupné nové řady přístrojů, je stále využíván v některých laboratořích. Další řada přístrojů, která zahrnuje modely ABI PRISM 3100 – avant a ABI PRISM 3130, obsahuje čtyři kapiláry, což umožňuje provádět více analýz vzorků současně. ABI PRISM 3100 (viz Obr. 1) má dokonce 16 kapilár stejně jako nová řada ABI PRISM 3130 a ABI PRISM 3130xl, která je však mnohem více automatizovaná. Přístroje této řady kontrolují veškeré použité chemikálie i optimální využití kapilár a jsou

proto vhodné pro laboratoře, kde se zpracovává velké množství vzorků a je nutné pracovat v systému kvality (QA). Dostupný je i zcela nový genetický analyzátor ABI PRISM 3500 Dx, obsahující osm kapilár, který je vhodný jak pro analýzu *in vitro* kultur v medicíně, tak i pro fragmentační a sekvenační analýzu (<http://www.appliedbiosystems.com/>).

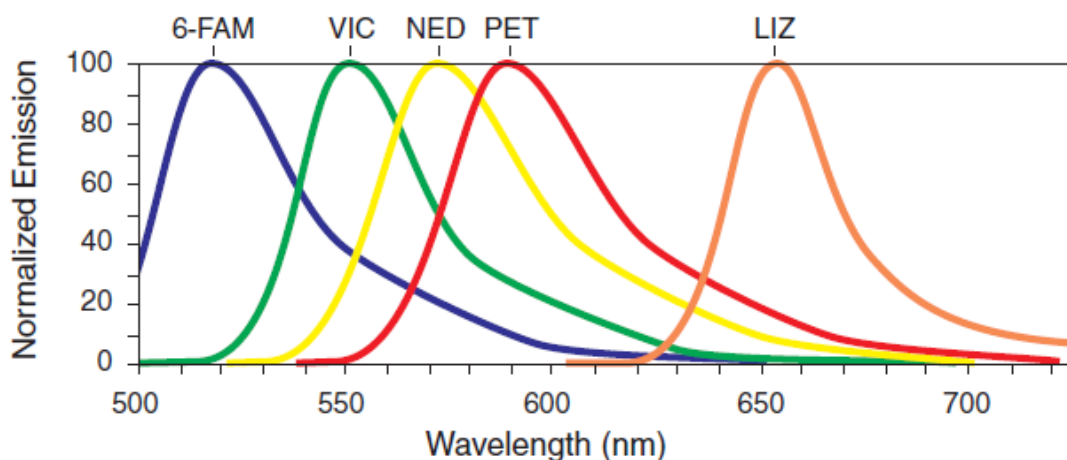
Obr. 1: Schéma genetického analyzátoru ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems 2003).



1.2 Fluorescenční barvení, fluorescenční barvy

Metoda fluorescenčního barvení je založena na fyzikálních jevech emise a excitace světla. Fluorescenční barvení, tj. navázání vhodných fluorescenčních barev na jednotlivé fragmenty DNA, umožňuje analyzovat mnoho nezávislých lokusů v jednom nástríku. Intenzita fluorescence jednotlivých barev se liší, proto je důležité zvolit správné množství barvy pro získání požadovaných výsledků. To znamená, že pro stejnou intenzitu jedné barvy se musí jiné barvy přidat až několikanásobně více nebo několikanásobně méně. Při analýze se nevyužívá pouze jedna barva, ale používají se tzv. komplexy barev (multiple-colours). Komplexy obsahují až pět barev, z nichž je vždy jedna vyhrazena pro vnitřní standard (viz Obr. 2), ostatní slouží pro zviditelnění fragmentů určité délky. Emisní a excitační spektrum barvy závisí na použité DNA, na chemické struktuře barvy a na fyzikálních podmínkách (pufr, pH, koncentrace, složení polymerů, aj.). Závisí také na tom, zda se jedná o jednovláknovou DNA (ss-DNA) nebo o dvouvláknovou DNA (ds-DNA). Od charakteru barvy se odvíjí i její detekce (Applied Biosystems 2000).

Obr. 2: Emisní spektra pěti fluorescenčních barev použitých v AmpF(STR)[®] Identifier PCR Amplification Kit, barva LIZ je zde vyhrazena pro vnitřní standard (Applied Biosystems 2006).



Mezi přední výrobce příslušenství a vybavení pro CE patří firma Applied Biosystems, platí to i pro přípravu fluorescenčních barev. K dostupným barvám na trhu patří například 5-FAM, 6-FAM, R110, TET, JOE, R6G, HEX, NED, TAMRA, ROX. Každá z těchto barev, po excitaci argonovým laserem, emituje spojité spektrum světla (Applied Biosystems 2000). Maximální emisní a excitační vlnová délka jednotlivých fluorescenčních barev je uvedena v následující tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Maximální emisní a excitační vlnová délka jednotlivých fluorescenčních barev (Applied Biosystems 2000).

Dye ^a	Emission λ_{\max} (nm)	Excitation λ_{\max} (nm)
6-FAM	517	494
5-FAM	522	493
R110	525	501
TET	538	522
R6G	549	529
HEX	553	535
JOE	554	528
TAMRA ([F]dNTP)	572	555
NED	575	553
TAMRA	583	560
ROX	607	587

^a všechny oligonukleotidy byly fluorescenčně značeny za následujících podmínek: doba značení 10-7 min, 1X TE pufr, pH 8.0, laboratorní teplota, detekční systém TaqMan[®] LS-50B PCR

1.3 Detekce fluorescence, matrice

Detekce jednotlivých částic proudících kapilárou se provádí několika způsoby, například hmotnostní spektrometrií, měřením absorpance v UV/Vis oblasti apod. Při využívání fluorescenčních barev se k detekci používá fluorescenční detektor s duálním argonovým laserem, který je schopný generovat dva světelné paprsky různých vlnových délek pro excitaci fluorescenčních barev. Ty následně vyzáří přijatou energii v podobě barevného světla, které zachytí detektor přístroje. Například přístroje pro kapilární elektroforézu ABI PRISM 310 (starší model) i ABI PRISM 3100 (novější verze přístroje) používají argon-ion laser s excitačními vlnovými délkami 488 a 514,5 nm. Detektor naopak pracuje s co nejširší oblastí, aby byla zachována dostatečná přesnost detekce (Applied Biosystems 2000, Applied Biosystems 2003).

Další důležitou složku procesu analýzy tvoří matrice. Jedná se o nastavení parametrů analýzy vytvořením kalibrační křivky ze standardních vzorků. Matrice může mít velký vliv na průběh analýzy a následně i na kvalitu výsledků, jde o tzv. matrix effects. V kapilární elektroforéze se matrice nastavuje pomocí fluorescenčních barev. Pro nastavení se nechají „běžet“ postupně všechny standardy použitých barev, tak aby se nadefinovalo množství emitované fluorescence ve všech detekčních oblastech. Emisní spektra barev se mění se změnou fyzikálních podmínek, jako je např. pH, a proto je nutné znovu nastavit matici vždy, když se tyto podmínky změní (Applied Biosystems 2000).

1.4 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza se zabývá fragmenty DNA a využívá je k identifikaci jedince, zjišťování příbuzenských vztahů a k určování otcovství. DNA fragmenty jsou fluorescenčně naznačeny během PCR (polymerázová řetězová reakce) reakce pomocí specifických primerů a fluorescenčních barev, následnou analýzou se získá elektroforetogram s kombinací píků typických pro daného jedince (DNA profil).

Fragmenty DNA jsou reprezentovány jednotlivými píky v elektroforetogramu. Délka těchto fragmentů se porovnává s vnitřním standardem (Internal Size Standard), což je soubor fragmentů známé délky značený odlišnou fluorescenční barvou, který se analyzuje spolu se vzorkem testované DNA. Intenzita signálu (fluorescence) je znázorněna výškou píků (Butler 2005).

1.5 Sekvenační analýza

Sekvenační analýza je stanovení primární struktury DNA, tj. přesného pořadí jednotlivých nukleotidů (Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin) (Klug *et al.* 2006). Znalost přesného pořadí jednotlivých nukleotidů se využívá v mnoha oborech, jako jsou medicínská diagnostika některých chorob nebo vrozených vad, forenzní biologie, což je využití biologie pro právní účely (forenzní antropologie, odontologie...) a v neposlední řadě biologická klasifikace a biotechnologie. Sekvenační analýza mitochondriální DNA (mtDNA) je důležitým nástrojem forenzních genetiků vhodným pro identifikaci lidských pozůstatků např. při hromadných neštěstích, při nálezů masových hrobů nebo v případech degradované DNA (viz kapitola 2.1.1). Všeobecné používání fluorescenčních barev zjednodušuje DNA sekvenování a celou CE. Čtyři různé fluorescenční barvy odpovídají čtyřem nukleotidům. Obvykle se Thymin značí červeně, Cytosin modře, Adenin zeleně a Guanin je značen žlutě. Sekvenační analýzu lze provádět na rozmanitých přístrojích včetně ABI PRISM 310, ABI PRISM 3100 a ABI PRISM 377 (Butler 2005). Výsledkem primární sekvenační analýzy je elektroforetogram, jak ukazuje obrázek (Obr. 3). Následuje sekundární sekvenační analýza, kdy jsou data nashromážděná pomocí Data collection softwaru v sekvenátoru zpracována vhodným softwarem. Data se zpracovávají pomocí algoritmů pro vyhodnocení výsledků např. odhalení jednotlivých mutací (<http://www.appliedbiosystems.com/>).

Sekvenací DNA se zabývá mnoho světových projektů, jedním z nich je Human Genome Project, který v roce 2003 dokončil po třinácti letech nové genetické mapy chromozómů pro současnou populaci. Napomáhá tím vývoji nových technologií, diagnostice různých nemocí atd. (http://www.accessexcellence.org/RC/AB/IE/Intro_The_Human_Genome.php).

ACTAGTGGATCCCCCGGCGCTGCAGGAATTCGAGCCACGACTTGATGA
#60 #70 #80 #90
#100 #110 #120 #130 #140
#150 #160 #170 #180 #190
#200 #210 #220 #230 #240
#250 #260 #270 #280 #290 #300

TCTCTCTTTTCTCAGCGCACACGGACGCGAGCTGGGGGCCGTCTGTCG
TCTCTCTTTTCTCAGCGCACACGGACGCGAGCTGGGGGCCGTCTGTCG
TTCTTGAATTGTTGTCGATTGTTGATCTCACCGRATGATGTTG
TCTCTCTTTTCTCAGCGCACACGGACGCGAGCTGGGGGCCGTCTGTCG
CGCCCCAAGCAATCCGTGCTGTGCTATCCCGAGCCACCGACTCCC

Kapilární elektroforéza je všestranně využitelná metoda, která v některých případech přebírá úkoly dříve řešené například metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). V dnešní době se využívá v mnoha různých oborech. Metoda se neustále vyvíjí, zdokonalují se nejen přístroje a chemikálie (polymery, fluorescenční barvy, apod.), ale i kity a vyhodnocovací softwary. Také proto ještě není kapacita této metody zcela využita a lze jen očekávat, že metoda pronikne i do dalších oblastí vědy. Dále se v této kapitole zaměřím zejména na její aplikaci ve forenzním zkoumání.

Nové metody extrakce DNA, její separace od ostatního buněčného materiálu, způsoby uchovávání, ale také možnosti kvantifikace a detekce umožňují stále větší využití metody CE ve forenzním zkoumání (Tagliaro *et al.* 2006). Jedná se především o identifikaci osob při hromadných neštěstích, identifikaci pachatele trestného činu, identifikaci pohřešované osoby, případně určení otcovství. Základem analýzy DNA je exponenciální amplifikace pomocí PCR, po které následuje analýza fragmentů DNA lišících se délkou nebo zjištění sekvence vybraných oblastí zkoumané DNA. Forenzní genetika se zaměřuje především na analýzu fragmentů obsahujících variabilní počet tandemových repetitiv (VNTR) nebo oblasti s krátkými

tandemovými repeticemi (STR oblasti), které vykazují vysokou variabilitu v populaci (Tagliaro *et al.* 1996). Analýza autozomálních STR je v dnešní době nejvíce využívanou metodou pro účely stanovení individuální identifikace osob a určování příbuzenských vztahů. Pro tuto oblast zkoumání, ale nejen pro ni, se neustále vyvíjejí nové, komerčně dostupné amplifikační kity.

Další důležitou analýzou je analýza STR oblastí na Y-chromozómu, kterou lze využít pro „skupinové“ určení příbuzenského vztahu na základě zařazení jedince mužského pohlaví do jedné paternální linie, tj. skupiny jedinců se shodným haplotypem Y-chromozómu (Goundar *et al.* 2009). Díky své citlivosti je metoda schopna zachytit mužskou DNA i ve vzorku kde převažuje ženská DNA až stonásobně nad DNA mužskou. Proto je pro účely forenzního genetického zkoumání vhodná především pro analýzu smíšených vzorků v případech znásilnění (poševní stěry) a při analýze epiteliálních zbytků nalezených pod nehty oběti (Butler 2003).

Novou oblastí, na kterou se v současné době zaměřuje výzkum, je forenzní analýza využívající SNP částice, mitochondriální DNA nebo mRNA pro specifické geny v tělních tekutinách, což by mohlo být v budoucnu použito pro specifické stanovení tkáně, ze které byl DNA profil získán, tj. krev, sliny, sperma atd. (Tagliaro *et al.* 2006).

V neposlední řadě se metoda CE používá i pro non-human analýzu DNA, především při šlechtění dobytka a koní a pro určení přesného původu daného jedince, v případech pašování exotických druhů zvěře nebo páchání trestných činů. Samozřejmě má analýza DNA i svá omezení, mezi která patří především degradace DNA, nebo kontaminace DNA ať už další osobou (například osobou, která se vzorkem manipulovala) či látkami, které se do vzorku mohou dostat z okolního prostředí a tím ztížit jeho analýzu. Na tyto a další negativní činitele se zaměřuje neustálý výzkum, který má za cíl co nejvíce eliminovat omezení metody a přispět tak k přesnějším výsledkům.

2.1.1 Analýza mitochondriální DNA

Kromě jaderné DNA lze k identifikaci jedince využít i mitochondriální DNA (mtDNA). Analýza mtDNA (sekvenační analýza) se často využívá ve forenzním zkoumání, a také v archeologii a antropologii. Ve forenzní praxi se mtDNA využívá v případech, kdy získaná jaderná DNA není pro standardní STR analýzu vhodná. Typicky se tento jev vyskytuje u tkání, především vlasů a kostí, kde je jaderné DNA nedostatek pro analýzu, nebo v případech

poškozených ostatků, kdy je jaderná DNA zničena a mtDNA je zachována (např: spálené ostatky nebo ostatky ve vysokém stádiu rozkladu). Analýzu mtDNA lze provést z DNA získané ze zubů, vlasů bez kořínku nebo z kostí, popřípadě i z degradovaných stop. Proto se mtDNA využívá hlavně při identifikaci obětí hromadných nehod nebo při nálezů masových hrobů (Buckleton *et al.* 2005). Při sekvenční analýze mtDNA jsou nejčastěji zkoumány dva hypervariabilní úseky (HVI a HVII) nacházející se na nerekombinantní části mitochondriálního genomu. Tyto úseky poskytují informace, které slouží k odlišení dvou nepříbuzných jedinců (Budowle *et al.* 1999).

2.1.2 Analýza STR na Y-chromozómu

Fragmentační analýza STR na Y-chromozómu se stále více využívá při určování paternální linie. Na základě této analýzy lze mužského jedince zařadit do příslušné skupiny podle shodnosti Y-STR markerů, jak ukazuje např. nedávná studie provedená v České republice (Zastera *et al.* 2010). Y-chromozóm se vyskytuje pouze u mužů, a proto jsou genetické markery na Y-chromozómu specifické pro mužskou část smíšeného biologického materiálu (biologický materiál obsahující DNA dvou osob – muže a ženy) při vyšetřování případů znásilnění nebo při analýze epiteliálních buněk ve vzorcích zpod nehtů obětí. Stejně tak může být analýza Y-chromozómu využita při vyšetřování pohřešovaných osob, při historických výzkumech nebo při určování genealogických vztahů (<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/>). Tato analýza je založená na skutečnosti, že STR jsou umístěny na nerekombinační části Y-chromozómu, takže se genetická informace přenáší z otce na syna beze změny. Výjimkou jsou mutace na Y-chromozómu (Butler 2006). Y-STR lokusy se široce využívají v laboratořích po celém světě pro určení skupinové příslušnosti a pro genealogii (Butler 2003).

Tab. 2 ukazuje přehled Y-STR lokusů, jejich umístění na chromozómu, alelové rozpětí a stupeň mutace.

Tab. 2: Charakterizace STR na Y-chromozómu (Butler 2006).

STR Marker	Position (Mb)	Repeat Motif	Allele Range	Mutation Rate (%)
DYS393	3.17	AGAT	8–17	0.05
DYS19	10.12	TAGA	10–19	0.20
DYS391	12.54	TCTA	6–14	0.40
DYS439	12.95	AGAT	8–15	0.38
DYS389I/II	13.05	[TCTG] [TCTA]	9–17/24–34	0.20, 0.31
DYS438	13.38	TTTTC	6–14	0.09
DYS390	15.71	[TCTA] [TCTG]	17–28	0.32
DYS385 a/b	19.19, 19.23	GAAA	7–28	0.23
DYS392	20.97	TAT	6–20	0.05

2.1.3 Využití analýzy DNA u zvířat

Šlechtění zvířat provází lidstvo po celá staletí. Zvířata s lepšími znaky, jako je vyšší dojivost u dobytka nebo rychlost a síla u koní, jsou využívána pro chov po mnoho generací. Dříve se tyto znaky posuzovaly pozorováním daného jedince, dnes se tato praxe přenesla do oblasti molekulární biologie, kdy se využívá DNA. PCR amplifikaci a detekci krátkých repetitivních sekvencí nebo mikrosatelitů lze aplikovat i na zvířata. Takto lze určit jedince s kvalitnějšími genetickými znaky rychleji, spolehlivěji a levněji než předchozími metodami. Materiální vybavení pro analýzu je stejné jako pro lidskou DNA, používají se stejné přístroje, mezi kity pro analýzu zvířecí DNA patří např. StockMarks[®] vhodný pro koně, dobytek a psy (Applied Biosystems 2007). Vytvoření DNA profilu u daného zvířete slouží k jeho identifikaci stejně jako u člověka. V roce 2009 se britským forenzním vědcům podařilo určit konkrétního psa podle jeho DNA profilu získaného z krve z místa činu. Do té doby byli vědci schopni určit pouze plemeno psa, ale ne přesného jedince. Celé vyšetřování vedlo k zatčení majitele psa, který ho použil jako vražednou zbraň. (http://news.bbc.co.uk/2/hi/uk_news/england/london/8559319.stm). Tímto tématem se dále zabývají forenzní zoologové, kteří pracují na analýze psí DNA a jejím využití ve forenzním vyšetřování (Ogden *et al.* 2009).

Sekvenační analýza genu pro cytochrom *b* může napomoci správnému zařazení druhů do fylogenetické linie a lze ji aplikovat na ptáky, savce, plazy, obojživelníky i ryby (Parson *et al.* 2000). Ve forenzní praxi se tato metoda využívá k odhalení původu pašované exotické zvěře, např. papoušků.

2.2 Využití kapilární elektroforézy v medicíně

Kapilární elektroforéza nahrazuje obvyklé klinické laboratorní metody, poskytuje rychlejší zpracování velkého množství vzorků a je snáze ovladatelná. V dnešní době se využívá při diagnostice mnoha chorob, včetně prenatalní diagnostiky vrozených vad, např. Downova syndromu. Pro tento účel se DNA získává po odběru plodové vody (po 15. týdnu těhotenství) z amniotických buněk, kde jsou sledovány STR oblasti na chromozómu 21 především D21S11. V elektroforetogramu se pak objeví jeden pík (nebo dva v poměru 1:1) pro normální genotyp a 3 píky (jedná se o trisomii 21. chromozómu) v poměru 1:1:1 (dva píky v poměru 2:1) pro genotyp s vrozenou vadou (Gelfi *et al.* 1995).

3 STR analýza ve forenzní praxi

V 90. letech 20. století došlo ke změnám technologií v oblasti PCR pro STR lokusy. Tak se analýza STR dostala do vedoucí pozice mezi metodami vhodnými pro identifikaci jedince. V současnosti postupně nahrazuje dříve používané metody, například minisatelitní analýzu a analýzu jediného lokusu využívající VNTR částice. STR analýza využívá lokusy obsahující krátké tandemové repetice, což jsou specifické úseky DNA vykazující vysokou variabilitu v populaci. Výhodou metody je mnohem menší množství vstupního materiálu potřebné pro analýzu a spolehlivější výsledky než metody uvedené výše (Buckleton *et al.* 2005).

3.1 STR a STR oblasti

Každý jedinec má unikátní DNA. Výjimku tvoří jednovaječná dvojčata, ale i ta se mohou lišit v minoritním měřítku v důsledku mutací. STR lokus obsahuje repetitivní segment dlouhý od dvou do osmi bází (dimery, trimery, tetramery...), který vykazuje určitou variabilitu pro danou populaci. Čím více lokusů je studováno, tím menší je pravděpodobnost náhodné shody dvou DNA profilů, které vycházejí od dvou zcela nepříbuzných jedinců. Míra této pravděpodobnosti závisí na frekvenci jednotlivých znaků v populaci. Pro jednoznačné stanovení individuální identifikace je zapotřebí testovat minimálně osm lokusů tak, aby se pravděpodobnost vyloučení náhodného jedince pohybovala okolo 1×10^{-10} , což je dostačující hodnota např. pro soudní jednání (Butler 2005). Lokusy obsahující dimerní tandemové repetice se ve forenzní praxi, pro lidskou DNA, nepoužívají pro svou náchylnost k vytváření stutterů (viz kapitola 5.2) a špatného navázání mezi bázemi, které znemožňuje správnou interpretaci výsledků. Naopak při STR analýze DNA koní a skotu nejsou jiné než dimerní tandemové repetice dostupné. Trimerní, tetramerní a pentamerní lokusy jsou vůči těmto jevům více odolné a proto jsou také mnohem vhodnější pro STR analýzu. STR lokusy se vybírají na základě několika kritérií, mezi která patří: vysoká variabilita v dané populaci, požadovaná délka spadající do rozmezí 90-500 bp (kratší úseky podléhají méně degradaci) (Buckleton *et al.* 2005). Mezi další kritéria STR lokusů patří i nízká míra mutací DNA, nízké procento stutterů pro daný lokus a v neposlední řadě je nutné znát i přesné umístění lokusu na chromozómu. Názvosloví lokusů závislé na jejich přesném umístění na chromozómu umožňuje komunikaci mezi jednotlivými pracovišti, ať už se jedná o laboratoře nebo

komerční firmy (Butler 2005). Některé STR lokusy, jejich umístění na chromozómu, příslušnou fluorescenční barvu a zastoupení v jednotlivých kitech firmy Applied Biosystems ukazuje tabulka (Tab. 3). Pro analýzu DNA se využívají specifické kity, o kterých se zmíním v následující kapitole.

3.2 Komerčně dostupné kity pro STR analýzu

S rozvojem technologií v 90. letech 20. století rostl počet STR lokusů amplifikovaných v jednom multiplexu. Z původních 3-4 STR lokusů značených stříbrem se dnešní kity dostaly až na počet 15 a více STR lokusů značených fluorescenčními barvami. Komerční firmy hrají v tomto vývoji velkou roli a podílejí se na kombinacích STR lokusů v jednotlivých kitech. Komerční kity jsou používány především v laboratořích zabývajících se diagnostikou nebo rutinním forenzním zkoumáním, které tak mohou porovnávat jednotlivé výsledky a analýza je pro ně méně časově náročná. Menší laboratoře si naopak multiplexy tvoří samy a přispívají tak k jejich vývoji.

Mezi hlavní dva výrobce STR kitů využívaných ve forenzní praxi patří americké firmy Applied Biosystems (Foster City, Kalifornie) a Promega Corporation (Medison, Viskonsin). Jejich kity se liší nejen v počtu zastoupených lokusů, ale i vnitřním standardem. Kity Applied Biosystems obsahují vnitřní standard se 16 fragmenty DNA, který je značený fluorescenčními barvami ROX (červená) pro čtyřbarevnou analýzu nebo LIZ (oranžová) pro pětibarevnou analýzu. Kity PowerPlex[®] od Promega Corporation obsahují vnitřní standard Internal Lane Standard 600 (ILS 600), který obsahuje 22 DNA fragmentů v rozpětí 60-600bp a je značen fluorescenční barvou CRX (červená) (Butler 2005).

Tab. 3: STR lokusy, jejich umístění na chromozómu a příslušná fluorescenční barva pro daný STR kit (upraveno podle <http://www.appliedbiosystems.com/>).

Locus	Chromosome Location	Identifiler [®] kit	SEfiler [™] kit	SGM Plus [®] kit	Profiler Plus [®] kit	COfiler [®] kit	Profiler [®] kit	MiniFiler [™] kit
CSF1PO	5q33.3-34	6-FAM [™]				JOE [™]	JOE [™]	PET [®]
D2S1338	2q35-37.1	VIC [®]	6-FAM [™]	5-FAM [™]				VIC [®]
D3S1358	3p	VIC [®]	6-FAM [™]	5-FAM [™]	5-FAM [™]	5-FAM [™]	5-FAM [™]	
D5S818	5q21-31	PET [®]			NED [™]		NED [™]	
D7S820	7q11.21-22	6-FAM [™]			NED [™]	NED [™]	NED [™]	6-FAM [™]
D8S1179	8q24.13	6-FAM [™]	VIC [®]	JOE [™]	JOE [™]			
D13S317	13q22-31	VIC [®]			NED [™]		NED [™]	6-FAM [™]
D16S539	16q24-qter	VIC [®]	6-FAM [™]	5-FAM [™]		5-FAM [™]		NED [™]
D18S51	18q21.3	NED [™]	PET [®]	JOE [™]	JOE [™]			NED [™]
D19S433	19q12-13.1	NED [™]	NED [™]	NED [™]				
D21S11	21q11.2 - q21	6-FAM [™]	PET [®]	JOE [™]	JOE [™]			VIC [®]
FGA	4q28	PET [®]	NED [™]	NED [™]	5-FAM [™]		5-FAM [™]	PET [®]
TH01	11p15.5	VIC [®]	NED [™]	NED [™]		JOE [™]	JOE [™]	
TPOX	2p23-2per	NED [™]				JOE [™]	JOE [™]	
vWA	12p12-pter	NED [™]	6-FAM [™]	5-FAM [™]	5-FAM [™]		5-FAM [™]	
SE33	6q14		VIC [®]					
Amelogenin	X: p22.1-22.3 Y: p11.2	PET [®]	VIC [®]	JOE [™]	JOE [™]	JOE [™]	JOE [™]	VIC [®]

3.2.1 Příklady komerčních kitů firmy Applied biosystems pro STR analýzu využívaných ve forenzní praxi

AmpF_LSTR[®] Identifiler[®] Plus

Tento kit zahrnuje celkem 15 lokusů obsahujících tetranukleotidové repetice a amelogeninový systém pro určení pohlaví. Primery jsou navrženy tak, aby nevznikaly artefakty špatným navázáním fluorescenční barvy na primer tzv. dye-labeling artefacts. AmpF_LSTR[®] Identifiler[®] Plus obsahuje tyto STR lokusy: D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWA, TPOX, D18S51, amelogenin, D5S818, FGA. Třináct lokusů je shodných s CODIS (Combined DNA Index Systems), což je software umožňující vedení DNA databáze navržený FBI (Federal Bureau of Investigation). V roce 2005 tato databáze obsahovala více než 1,5 milionu STR profilů v dubnu 2010 již přes 8 milionů STR profilů (<http://www.fbi.gov/hq/lab/codis/clickmap.htm>), které napomáhají vyšetřování trestných činů napříč všemi padesáti státy USA (Butler 2005). Tento software využívá přes 40 dalších států včetně České republiky. Zbylé 2 lokusy D2S1338 a D19S433 jsou shodné s AmpF_LSTR SGM Plus[™] PCR Amplification Kit. Identifiler[®] Plus využívá pětibarevné fluorescenční značení, kde je jedna barva vyhrazena pro vnitřní standard - GeneScan[™] 500 LIZ[®] Size Standard (Applied Biosystems 2009a).

AmpF_LSTR[®] Yfiler[™]

Yfiler[™] je kit, který amplifikuje celkem 17 STR lokusů vyskytujících se na nerekombinační části Y-chromozómu. Jedenáct z nich je doporučeno SWGDAM (Scientific Working Group – DNA Analysis Methods): DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS438 a DYS439 zbylých 6 lokusů je vysoce polymorfních a jsou to tyto: DYS437, DYS448, DYS456, DYS458, DYS635 (Y-GATA C4) a Y-GATA H4. Lokusy jsou značeny fluorescenčními barvami 6-FAM, VIC, NED a PET Poslední barva LIZ je vyhrazena pro GeneScan – 500 Size Standard (Applied Biosystems 2006b). Srovnávací studie prokázala vysoký stupeň shodnosti výsledků mezi kitem Yfiler[™] (Applied Biosystems) a PowerPlex[®] Y (Promega), což umožňuje srovnávání výsledků, i když byly pro analýzu použity rozdílné amplifikační kity. Je to dáno faktem, že Yfiler[™] obsahuje stejných 12 lokusů jako PowerPlex[®] Y, liší se tedy jen pěti lokusy, které jsou u Yfiler[™] navíc (Gross *et al.* 2006). Mohou se však objevit rozdíly ve výsledcích mezi jednotlivými laboratořemi, jak

prokázala srovnávací studie z roku 2008. Porovnávány byly běžně využívané komerční kity Yfiler™ (Applied Biosystems) a PowerPlex® Y (Promega), ale také méně známé kity běžné v německy mluvících zemích střední Evropy: Y-nanoplex (Biotype) a DYSpLex (SERAC). Prokázalo se, že ve výsledcích se může výška pík pro jednotlivé lokusy lišit. Tyto rozdíly byly způsobeny odlišnými laboratorními postupy (Parson *et al.* 2008).

AmpFISTR® MiniFiler™

Poslední generace autozomálních STR multiplexů jako je Identifiler® (Applied Biosystems) a PowerPlex® 16 (Promega) využívají celkem 15 STR lokusů společně s amelogeninovým lokusem v jedné reakci a mají široké využití ve forenzní genetice. Nicméně velké lokusy jsou náchylné k alelickému drop-out a to v případech, kdy je DNA degradována (rozštěpena enzymy na menší fragmenty) nebo její vzorek obsahuje PCR inhibitory (Mg²⁺, KCl, NaCl, iontové detergenty jako je SDS, etanol, isopropanol, fenol, atd.). Proto byly vyvinuty primery, které redukují délku ampliconů tak, aby se vytvořily mini STR sekvence. V roce 2007 uvedl Applied Biosystems první komerčně dostupný mini STR multiplex tzv. AmpFISTR® MiniFiler™ PCR amplifikační kit. Obsahuje amelogeninový lokus a osm z velkých STR lokusů, které byly použity u AmpFISTR Identifileru. Jedná se o tyto: CSF1PO, FGA, D2S1338, D7S820, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, amplicony těchto lokusů jsou redukovány na délku do 201 bp (Alenizi *et al.* 2009). Pět z těchto lokusů je obsaženo též v AmpFISTR SGM Plus™ amplifikačním kitu. Pokud je k dispozici dostatečné množství DNA pro více analýz, je vhodné kombinovat výsledky získané z MiniFiler™ právě s Identifiler® nebo SGM Plus™, zvýší se tak možnost správného určení STR profilu (Mulero *et al.* 2008).

AmpFISTR® NGM™

AmpFISTR® NGM™ patří mezi nejnovější kity firmy Applied Biosystems a obsahuje STR lokusy doporučené pro evropské populace na základě spolupráce s ENFSI (European Network of Forensic Science Institute). Zahrnuje celkem 16 STR lokusů a amelogeninový systém pro určení pohlaví. Deset lokusů je shodných s AmpFISTR SGM Plus™ (D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01 a FGA). Dále amplifikuje 3 mini STR lokusy (D10S1248, D22S1045 a D2S441) a dva vysoce polymorfní

lokusy (D1S1656 a D12S391). Kit využívá vnitřní standard GS500 Size Standard kompatibilní s GeneMapper softwarem (Applied Biosystems 2009b).

3.2.2 Příklady komerčních kitů firmy Promega pro STR analýzu využívaných ve forenzní praxi

PowerPlex® 16

Jedná se o autozomální amplifikační kit, který zahrnuje celkem 16 STR lokusů: Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818, Amelogenin (pro určení pohlaví). PowerPlex® 16 používá tři fluorescenční barvy (fluorescein, TMR, JOE). Stejně jako PowerPlex® Y používá PowerPlex® 16 Internal Lane Standard 600 (ILS 600) (Promega 2008a). Analýza STR lokusů ve forenzní praxi je velmi úspěšná metoda už od svého založení. Za posledních 20 let se stala metodou vhodnou pro identifikaci lidských pozůstatků starších než 10 – 15 let. To potvrzuje i studie, která využívá pro identifikaci lidských pozůstatků z masových hrobů II. světové války mimo jiné i amplifikační kit PowerPlex® 16 (Marjanović *et al.* 2007).

PowerPlex® Y

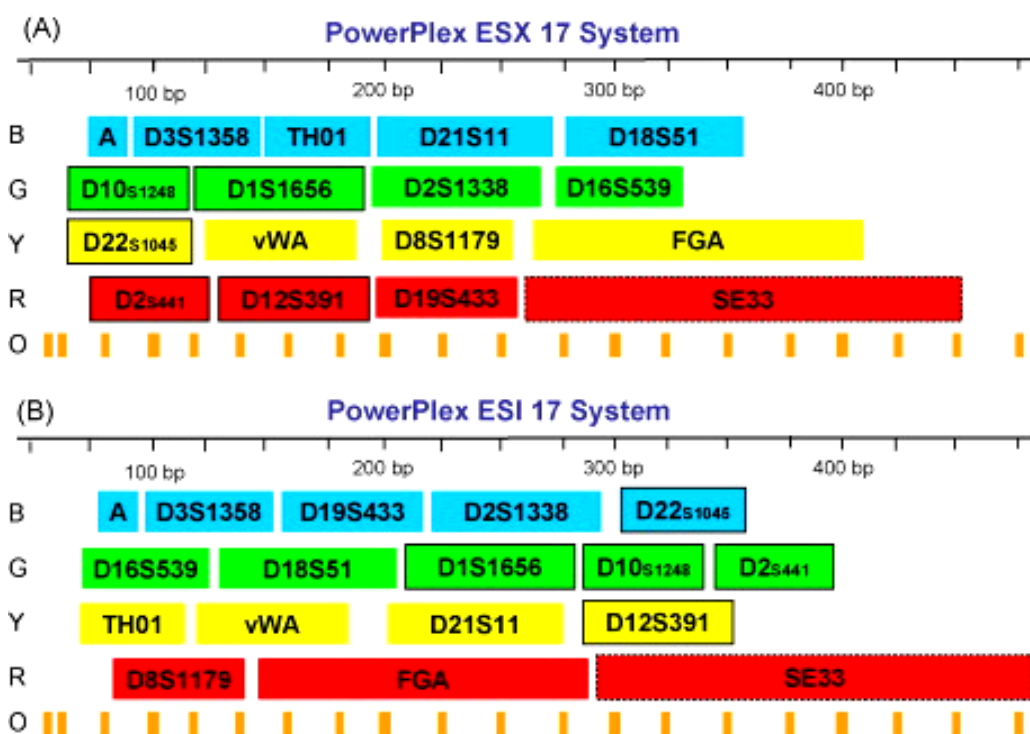
Y – STR markery se vyskytují na nerekombinantní části Y-chromozómu (NRY) a jsou využívány pro analýzu mužské DNA. PowerPlex® Y je jedním ze zástupců amplifikačních kitů obsahujících Y-STR markery. Poskytuje amplifikaci 12 lokusů a tří fluorescenčních barev (DYS19, DYS385a/b, DYS389I/II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS437, DYS438 a DYS439) a je kompatibilní s přístroji firmy Applied Biosystems. Primery specifické pro jednotlivé lokusy jsou značeny Fluoresceinem (FL), TMR nebo JOE. PowerPlex® Y využívá Internal Lane Standard 600 (ILS 600). Všech dvanáct lokusů je amplifikováno najednou v jedné multiplex PCR reakci (Promega 2008b). Tento kit byl využit např. k vytvoření haploskupin na základě výskytu haplotypů v České populaci (Zastera *et al.* 2010).

PowerPlex® ESX a ESI Systems

Firma Promega vyvinula ve spolupráci s ENFSI a EDNAP (European DNA Profiling Group) čtyři nové kity (PowerPlex® ESX 17 a PowerPlex® ESI 17, PowerPlex® ESX 16 a PowerPlex® ESI 16) pro použití v evropských laboratořích, aby bylo možné porovnávat

forenzní vzorky mezi jednotlivými státy. Každý z nich obsahuje pět nových lokusů vybraných ENFSI a EDNAP (mini STR lokusy menší než 125 bp D10S1248, D22S1045, D2S441, a midi STR lokusy od 125 do 185 bp D12S391, D1S1656) společně s 11 obvykle využívanými STR lokusy po celé Evropě (D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWA, D2S1338, D3S1358, D16S539, D19S433 a Amelogenin). Kity PowerPlex® ESX 16 a PowerPlex® ESI 16 jsou navrženy stejně jako PowerPlex® ESX 17 a PowerPlex® ESI 17, jediným rozdílem je, že neamplifikují lokus SE33. Jeden primer pro každý lokus je značen fluoresceinem, JOE, TMR-ET nebo CRX-ET a je následně rozpoznán jako modrý, zelený, žlutý a červený signál, poslední barva (oranžová) patří vnitřnímu standardu, v tomto případě CC5-labeled Internal Lane Standard 500 (CC5 ILS 500) (Promega 2009a, Promega 2009b). Kity PowerPlex® ESX 17 a PowerPlex® ESI 17 mají odlišně uspořádány a fluorescenčně značeny jednotlivé lokusy jak ukazuje obrázek (Obr. 4). Nejmenší lokusy (< 200bp) v PowerPlex® ESX 17 jsou navrženy tak aby v PowerPlex® ESI 17 byly větší (> 200 bp). Lokusy D12S391 a D1S1656 jsou v amplifikačních kitech zastoupeny poprvé, proto je není možné s ničím porovnat. Kity vykazují vysoký stupeň shodnosti u všech vzorků navržených NIST (National Institute of Standards and Technology), které byly analyzovány na obvykle využívaných komerčních kitech, kam patří Identifiler® a PowerPlex® 16 (Hill *et al.* 2010).

Obr. 4: Porovnání PowerPlex® ESX 17 a PowerPlex® ESI 17 systému (Hill *et al.* 2010).



4 Hodnocení elektroforetogramů (primárních dat)

Data, získaná analýzou DNA pomocí kapilární elektroforézy, mohou být zobrazena v podobě elektroforetogramu nebo tabulky (ve většině případů se používá kombinace obou variant). Výsledkem jednoho nástřiku je jeden elektroforetogram ukazující migraci fluorescenčně značených fragmentů v čase, které putují polymerem za působení elektrického pole. Intenzita fluorescence je dána výškou píků a je znázorněna na ose y, osa x pak znázorňuje migrační čas jednotlivých fragmentů, od kterého se odvíjí jejich délka. Čím vyšší je migrační čas, tím je fragment delší. Tabulka naopak podává přesné kvantitativní údaje. Pro vyhodnocování nasbíraných dat se využívají speciální softwary (Applied Biosystems 2000).

4.1 Příklad komerčně dostupných softwarů pro analýzu dat získaných kapilární elektroforézou

GeneScan, produkt firmy Applied Biosystems, je jedním ze starších, stále využívaných softwarů pro CE vhodných pro vyhodnocování dat získaných analýzou DNA např. na přístrojích ABI PRISM 310, ale i na novějších přístrojích, kde je však často nahrazován novějším softwarem GeneMapper (Applied Biosystems). Použití GeneScan softwaru je rychlejší a jednodušší než dříve používané metody. Rozlišovací schopnost softwaru je 5000 bp, přičemž je zachována dostatečná přesnost získaných výsledků. K vyhodnocování používá čtyři nebo pět fluorescenčních barev, z toho je vždy jedna vyhrazena pro vnitřní standard. Vnitřní standard (GeneScan Internal Lane Size Standard) se nanáší do stejné kapiláry jako experimentální vzorky. Podléhá tedy stejným elektroforetickým silám jako zkoumané vzorky a funguje jako kontrola. Porovnáním jednotlivých fragmentů s vnitřním standardem se stanoví jejich délka, což zajišťuje software. Firma Applied Biosystems nabízí 5 různých standardů, které jsou značeny fluorescenčními barvami TAMRA nebo ROX (viz Tab. 4). Každý standard je vhodný pro jinou délku DNA fragmentů (Applied Biosystems 2000).

Tab. 4: Vnitřní standardy (Applied Biosystems 2000).

Vnitřní standard	Délka fragmentů	Podmínky	Fluorescenční barva
GeneScan-350	35-350 bp	-	TAMRA nebo ROX
GeneScan-400HD	50-400 bp	-	TAMRA nebo ROX
GeneScan-500	35-500 bp	-	TAMRA nebo ROX
GeneScan-1000	100-900 bp 100-539 bp	Nedochází k denaturaci Dochází k denaturaci	Pouze ROX
GeneScan-2500	100-5000 bp 100-536 bp	Nedochází k denaturaci Dochází k denaturaci	TAMRA nebo ROX

K nové generaci softwarů lze zařadit GeneMapper, který v sobě kombinuje výhody GeneScan s novými a vylepšenými funkcemi (<http://www.appliedbiosystems.com/>). Zahrnuje v sobě několik algoritmů, které jsou schopny rozpoznat určité struktury (např. nesymetrické nebo rozštípnuté píky), jež se dříve musely zjišťovat manuálně. Nově používané algoritmy by měly pomoci ke správné interpretaci dat. Mezi další funkce GeneMapperu patří i zachycení LOH (lost of heterozygosity) nebo AFLP (amplified fragment polymorphism) (Applied Biosystems 2004), což je vizualizace stovek amplifikovaných DNA restrikčních fragmentů současně, která se využívá např. při hledání stupně shodnosti některých izolátů (Applied Biosystems 2000). Pro software GeneMapper se vyrábějí vnitřní standardy (Size Standards), které plní stejnou funkci jako vnitřní standardy u softwaru GeneScan. Jednotlivé standardy odpovídají určité délce fragmentů, jak ukazuje následující tabulka (Tab. 5).

Tab. 5: Vnitřní standardy GeneMapper (Applied Biosystems 2004).

Vnitřní standard	Délka fragmentů
377_F_HID_GS500	75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400
377_G5_HID_GS500	75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450
CE_F_HID_GS500	75, 100, 139, 150, 160, 200, 300, 340, 350, 400
CE_G5_HID_GS500	75, 100, 139, 150, 160, 200, 300, 340, 350, 400, 450

Firma SoftGenetics je konkurenčním výrobcem softwarů pro kapilární elektroforézu. GeneMarker software je schopný pracovat se čtyř nebo pěti barevným fluorescenčním značením a je kompatibilní s přístroji a amplifikačními kity firmy Applied Biosystems i Promega Corporation (<http://www.softgenetics.com/GeneMarker.html>).

5 DNA profil a jeho hodnocení

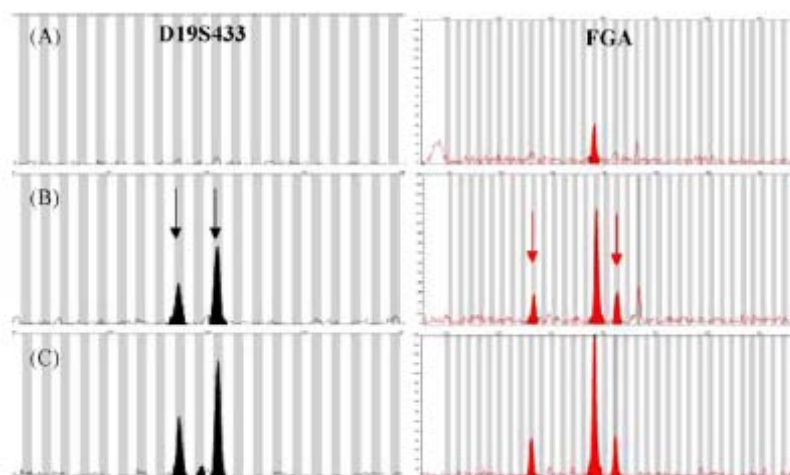
Karyotyp člověka tvoří 23 párů chromozómů (22 párů autozomů a 1 pár gonozomů). Na chromozómech jsou uloženy jednotlivé geny, které se mohou vyskytovat ve dvou různých formách. První forma je dominantní pro daný gen (**A**), druhá forma je naopak pro daný gen recesivní (**a**) (Klug *et al.* 2006). Tyto alely charakterizují genotyp každého jedince. Ve výsledku je tedy možné utvořit tři různé genotypy a to **AA** a **aa** pro homozygotního jedince a **Aa** pro heterozygotního jedince. DNA profil je pak kombinace genotypů získaných pomocí několika lokusů. Metoda DNA profilování (DNA typing) se zabývá určováním genotypů ve specifických místech molekuly DNA. Lokusy jsou specifické pro identifikaci jedince a danou populaci tak, aby byla minimalizována pravděpodobnost shody mezi dvěma náhodně vybranými nepříbuznými jedinci (Butler 2005). Je nezbytné porozumět jevům, které mohou být následkem genetické anomálie, PCR reakce, nebo mohou být způsobeny elektroforetickým zařízením, aby bylo možné rozpoznat, zda se jedná o smíšený vzorek nebo o vzorek DNA jednoho jedince (Buckleton *et al.* 2005).

5.1 Nespecifické artefakty

Nespecifické artefakty vznikají v průběhu PCR amplifikace STR alel a objevují se ve výsledném elektroforetogramu. Častým důvodem pro tyto neobvyklé píky je degradovaný vzorek DNA nebo kontaminace vzorku např. nevyužitými primery. Nelze je jakkoliv předvídat nebo určit jejich pozici ani tvar, může se jednat jak o odlišnou sekvenci STR alely tak o částečně renaturovaný produkt PCR. Tyto artefakty mohou ovlivnit celý výsledek elektroforézy (Buckleton *et al.* 2005). Existuje několik možností jak vylepšit kvalitu DNA profilu. Jednou z nich je navýšení PCR cyklů ze standardních 28 na 34 cyklů, druhou možností je post-PCR purifikace, která navyšuje senzitivitu kapilární elektroforézy (viz Obr. 5) (Michel *et al.* 2009).

Obr. 5: Vliv post-PCR purifikace na citlivost CE (Michel *et al.* 2009).

Elektroforetogram pro lokusy D19S433 a FGA ukazující obnovení píků po post-PCR purifikaci. A) 28 cyklů PCR bez post-PCR purifikace, B) 28 cyklů PCR po post-PCR purifikaci 1 μ injekci, C) 28 cyklů PCR po post-PCR purifikaci 4 μ injekci



5.2 Stutter píky

V průběhu PCR amplifikace di-, tri-, nebo tetranukleotidových mikrosatelitů vznikají minoritní produkty dlouhé 1-4 repetitivní jednotky. Tyto produkty jsou o 1-4 repetitivní jednotky kratší než hlavní alela, patří mezi minoritní píky a jsou označovány jako stutter. Mohou vznikat v důsledku klouzáni polymerázy při prodlužování (elongaci) DNA vlákna. Stutter píky komplikují analýzu dat u vzorků, mohou dokonce způsobit záměnu homozygota (objevuje se jedna alela) za heterozygota (objevují se dvě alely) v případě, že se objeví v elektroforetogramu jedna alela a stutter pík. Proto může být obtížné rozlišit, zda se jedná o stutter pík nebo o minoritní alelu u smíšeného profilu. Amplifikace s velkým počtem stutter píků ukazuje právě na smíšený profil nebo na další problémy PCR a elektroforézy (Applied Biosystems 2000). Proporce stutteru jsou měřeny rozdílem mezi výškou stutteru a výškou hlavní alely, stutter pík by měl být menší než 20% výšky hlavní alely. Procento stutter píků roste u všech lokusů s navýšeným počtem PCR cyklů a také s rostoucím počtem templátové DNA. Procento stutterů dále závisí na tom, zda se jedná o di-, tri- nebo tetranukleotidovou repetici. V případě tetranukleotidových repetit se stuttery objevují přibližně v 15 % pro di- a trinukleotidové je toto procento mnohem vyšší až 30 % (Butler 2005). Při 34 cyklech PCR a vstupním množstvím 1ng DNA do PCR reakce se objevují stutter píky přibližně u 40 % alel,

zatímco při < 100 pg DNA se objevují stutter píky jen u 5 % alel (Gill *et al.* 2000). Některé STR lokusy jsou náchylnější k tvorbě stutterů více než jiné jak ukazuje tabulka (Tab. 6).

Tab. 6: Nejvyšší procenta stutterů naměřených pro jednotlivé alely za pomoci AmpFISTR® Identifier™ PCR Amplification Kit (Applied Biosystems 2006a).

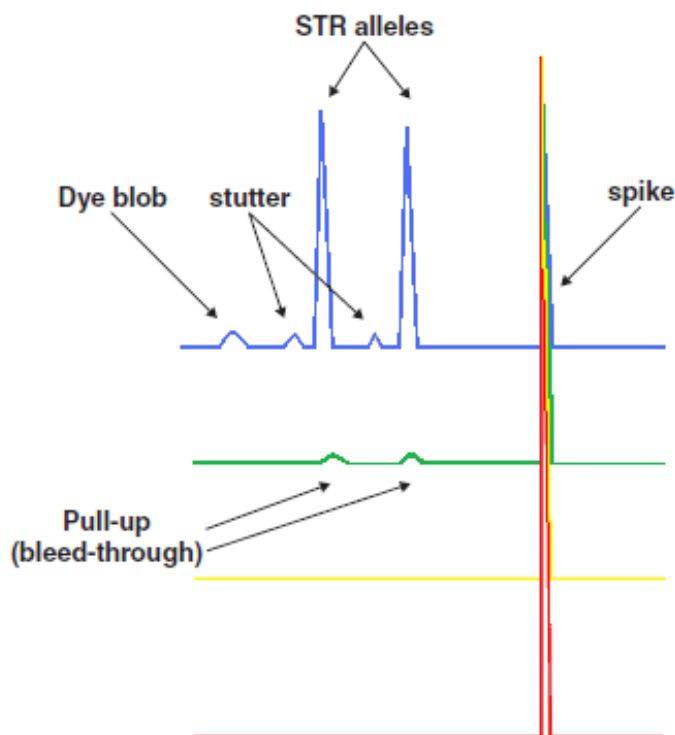
STR lokus	% stutterů	STR lokus	% stutterů	STR lokus	% stutterů
CSF1P0	9,2	D5S818	6,8	D13S317	8,0
D2S1338	11,1	D7S820	8,2	D16S539	10,4
D3S1358	10,7	D8S1179	8,2	D18S51	17,0
D19S433	13,3	D21S11	9,4	FGA	14,7
TH01	5,1	TPOX	4,8	vWA	12,6

5.3 Pull-up píky (Bleedthrough) a spikes

Pull-up píky, objevující se v elektroforetogramu, jsou malé píky jedné barvy ležící přímo pod velkými píky jiné barvy (Butler *et al.* 2004). Jejich vznik je způsoben dvěma důvody. První – matrice je vytvořena ze špatných setů filtrů nebo ze špatných fluorescenčních barev (špatně nastavená matrice). Druhým důvodem je signál některých velkých píků – pokud je mimo měřítko, mohou se vzorky překrývat (Applied Biosystems 2000).

Spikes jsou obvykle velmi ostré píky vyskytující se se stejnou intenzitou fluorescence napříč všemi barvami. Po re-injekci vzorku do kapiláry se tyto píky neobjevují na stejné pozici v elektroforetogramu (Butler 2005). Špatné nastavení matrice zapříčiňuje vychýlenou základní linii (baseline). Pokud tyto problémy (vychýlená baseline, pull-up píky a spikes) stále přetrvávají, je nutné reanalyzovat data. To znamená, že se použije nová matrice na starý vzorek dat a provede se nová analýza (Applied Biosystems 2000).

Obr. 6: Schéma elektroforetogramu obsahujícího Pull-up píky, spikes a stutter píky (upraveno podle Butler 2005).



5.4 Alelický drop-out („null“ alleles, „silent“ alleles)

Alelický drop-out vzniká při PCR amplifikaci, kdy při malém množství templátové DNA je jedna z alel více amplifikována než druhá. Pokud se tento jev objeví v případě heterozygotického genotypu (s dvěma odlišnými alelami) a jedna z alel se amplifikuje málo, vede drop-out k falešnému homozygotickému genotypu a tak ke špatné interpretaci dat (Miller *et al.* 2002).

6 Závěr

Kapilární gelová elektroforéza je všestranně využitelná metoda, která umožňuje jak sekvenační, tak fragmentační analýzu. Sekvenační analýza mitochondriální DNA patří mezi důležité metody forenzní genetiky při identifikaci jedince. Je vhodná pro analýzu vzorků degradované nebo inhibované DNA, pro identifikaci lidských pozůstatků při hromadných neštěstích nebo pro identifikaci těl z masových hrobů. V některých případech je analýza mtDNA schopna poskytnout dostatečné informace z DNA staré i několik desítek let. Do této

oblasti analýzy DNA pocházející z masových hrobů začíná pronikat i fragmentační analýza STR oblastí. V dnešní době je analýza STR lokusů nejdůležitější a nejvíce využívanou metodou, proto je jí v práci věnována největší část.

Pokroky STR analýzy za posledních 20 let jsou obrovské, o čemž svědčí stále se zlepšující instrumenty (softwary, kity, chemikálie, atp.). Od počátku metody byly vyvinuty i nové způsoby značení fragmentů a s tím související detekční mechanizmy. Nové přístroje jsou více automatizované, což vede ke snížení možnosti lidské chyby, popřípadě k menší možnosti kontaminace vzorku. Toto všechno přispívá k získání přesnějších výsledků a k jejich snazší interpretaci. Metoda splňuje požadavky, které jsou na ni dnes kladeny, ale stále má prostor pro další rozvoj. Lze očekávat nárůst počtu STR lokusů amplifikovaných v jedné reakci, jak napovídá dosavadní vývoj, který vedl od 4 lokusů značených stříbrem až k dnešním 15-17 lokusům značeným fluorescenčními barvami. Nárůst počtu fluorescenčních barev není tak velký přesto se dva hlavní výrobci v tomto směru liší. Applied Biosystems používá pětibarevné značení, naproti tomu Promega Corporation má ve svých kitech jen čtyřbarevné značení, přesto však dosahuje shodných mnohdy kvalitnějších výsledků. Produkty dalších firem zabývajících se výrobou komponent pro CE (Biotype, SERAC, SoftGenetics) nejsou tak běžně využívány jako produkty předchozích dvou zmíněných firem.

STR analýza neslouží jen pro identifikaci lidí nebo jejich zařazení do určité haploskupiny, ale pronikla již i do světa zvířat. Zde je pomocníkem při šlechtění dobytka a koní. V medicíně má své místo při diagnostikování genetických poruch a vrozených vad. Doplnuje tak klasické metody genealogie, toto spojení by mohlo určit původ některých genetických vad, které jsou doposud považované za spontánní. Vše však záleží na tom, zda se podaří získat dostatečné množství vzorků, které by podpořilo „rodokmenové“ vyšetření. V úvahu je však třeba vzít i možnosti etických problémů a případné zneužití získaných informací.

7 Seznam zkratek

zkratka	anglický název	český význam
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů
CE	Capillary Electrophoresis	kapilární elektroforéza
CODIS	Combined DNA Index Systems	databáze DNA pro USA
ds-DNA	double strand DNA	dvouvláknová DNA
ss-DNA	single strand DNA	jednovláknová DNA
EDNAP	The European Profiling Group	evropská vědecká skupina
ENFSI	European Network of Forensic Science Institute	evropský institut forenzních věd
FBI	Federal Bureau of Investigation	federální úřad pro vyšetřování
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOH	Lost of Heterozygosity	ztráta heterozygosity
mRNA	messenger RNA	messengerová DNA
mtDNA	mitochondrial DNA	mitochondriální DNA
NIST	National Institute of Standards and Technology	organizace podporující výzkum v USA
PCR	Polymerase Chain Reaction	polymerázová řetězová reakce
QA	Quality Assurance	záruka kvality
SNP	Single Nucleotide Polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
STR	Short Tandem Repeat	krátké tandemové repetice
SWGDM	Scientific Working Group on DNA Analysis Methods	vědecká pracovní skupina v oblasti DNA analytických metod
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat	variabilní počet tandemových repetice

8 Použitá literatura

- Alenizi M. A., Goodwin W., Hadi S., Alenizi H. H., Altamar K. A., Alsikel M.S., 2009, Concordance Between the AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ MiniFiler $^{\text{TM}}$ and AmpF ℓ STR $^{\circledR}$ Identifiler $^{\circledR}$ PCR Amplification Kits in the Kuwaiti Population, *J Forensic Sci*, 54(2), 350-352.
- Buckleton J., Triggs CH. Walsh M., S. J., 2005, Forensic DNA Evidence Interpretation, *CRC press*, p. 531.
- Budowle B., Wilson M. R., DiZinno J. A., Stauffer C., Fasano M. A., Holland M. M., Monson K. L., 1999, Mitochondrial DNA Regions HVI and HVII Population Data, *Forensic Science International*, 103(1), 23-35.
- Butler J. M., 2003, Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nukleotide Polymorphism Analysis, *Forensic Sci Rew*, 15(2), 91-111.
- Butler J. M., Buel E., Crivellentes F., McCords B. R., 2004, Forensic DNA Typing by Capillary Electrophoresis Using the ABI Prism 310 and 3100 Genetic Analyzers for STR Analysis, *Electrophoresis*, 25(10-11), 1397-1412.
- Butler J. M., 2005, Forensic DNA Typing, Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, *Elsevier Academic Press*, 2. vydání, p. 680.
- Butler J. M., 2006, Genetics and Genomics of Core Short Tandem Repeat Loci Used in Human Identity Testing, *J Forensic Sci*, 51(2), 253-265.
- Gelfi C., Cossu G., Carta P., Serra M., Righetti P. G., 1995, Gene Dosage in Capillary Electrophoresis: Pre-Natal Diagnosis of Down's Syndrome, *J Chromatogr A*, 718(2), 405-412.
- Gill P., Whitaker J., Flaxman CH., Brown N., Buckleton J., 2000, An Investigation of the Rigor Interpretation Rules for STRs Derived From Less than 100 pg of DNA, *Forensic Science International*, 112(1), 17-40.
- Gross A. M., Berdos P., Ballantyne J., 2006, Y-STR Concordance Study Between Y-plex $^{\text{TM}}$ 5, Y-plex $^{\text{TM}}$ 6, Y-plex $^{\text{TM}}$ 12, PowerPlex $^{\circledR}$ Y, Y-Filer $^{\text{TM}}$, MPI, and MPII, *J Forensic Sci*, 51(6), 1423-1428.

- Goundar A. A., van Oorschot R. A. H., Daniel R., Mitchel R. J., 2009, Investigation of Population Structure in the Victorian Italian and Greek Population Using Y Chromosome STR Haplotype Analysis, *Forensic science international: Genetics Supplement Series*, 2(1), 423-424.
- Hill C. R., Duewer D. L., Kline M. C., Sprecher C. J., McLaren R. S., Rabbach D. R., Krenke B. E., Ensenberger M. G., Fulmer P. M., Storts D. R., Butler J. M., 2010, Concordance and Population Studies along with Stutter and Peak Height Ratio Analysis for PowerPlex® ESX 17 and PowerPlex® ESI 17, *Forensic science international: Genetics*, xxx(xxx), xxx-xxx (p. 7) – Article in Press.
- Klug W. S., Cummings M. R., Spencer CH. A., 2006, Concepts of Genetic, *Pearson Education, Inc.*, 8. vydání, p. 784.
- Marjanović D., Durmić-Pašić A., Bakal N., Haverić S., Kalamujić B., Kovačević L., Ramić J., Pojskić N., Škaro V., Projić P., Bajrović K., Hadžiselimović R., Drobič K., Huffine E., Davoren J., Primorac D., 2007, DNA Identification of Skeletal Remains from World War II Mass Graves Uncovered in Slovenia, *Croat Med J.*, 48(4), 513-519.
- Michel S., De Bast A., Vandenbroere I., Froment O., 2009, Interpretation of low-copy-number DNA Profile after post-PCR Purification, *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2(1), 542-543.
- Miller C. R., Joyce P., Waits L. P., 2002, Assessing Allelic Dropout and Genotype Reliability Using Maximum Likelihood, *Genetics*, 160(1), 357-366.
- Mulero J. J., Chang Ch. V., Lagacé R. E., Wang D. Y., Bas J. L., McMahon T. P., Hennessy L. K., 2008, Development and Validation of the AmpFℓSTR® MiniFiler™ PCR Amplification kit: A miniSTR Multiplex for the Analysis of Degraded and/or PCR Inhibited DNA, *J Forensic Sci*, 52(4), 838-851.
- Parson W., Pegoraro K., Niederstätter H., Föger M., Steinlechner M., 2000, Species Identification by Means of the Cytochrome b Gene, *Int J Legal Med*, 114(1-2), 23–28.

- Parson W., Niederstätter H., Lindinger A., Gill P., 2008, Y-STR Analysis on DNA Mixture Samples – Results of a Collaborative Project of the ENFSI DNA Working Group, *Forensic science international: genetics*, 2(3), 238-242.
- Tagliaro F., Smith F. P., 1996, Forensic Capillary Electrophoresis, *Trends in analytical chemistry*, 15(10), 513-525.
- Tagliaro F., Bortolotti F., 2006, Recent Advances in the Application of CE to Forensic Science (2001-2004), *Electrophoresis*, 27(1), 231-243.
- Zastera J., Roewer L., Willuweit S., Sekerka P., Benesova L., Minarik M., 2010, Assembly of a Large Y-STR Haplotype Database for the Czech Population and Investigation of its Substructure, *Forensic science international: genetics*, 4(3), e75-e78.

Materiály komerčních firem:

- Applied Biosystems 2000, Chemistry Reference for the ABI PRISM[®]310 Genetic Analyzer, GeneScan[®] Reference Guide,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040961.pdf .
- Applied Biosystems 2003, ABI PRISM[®]3100/3100-Avant Genetic Analyzer, User Guide,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_041428.pdf .
- Applied Biosystems 2004, GeneMapper[®] ID Software Versions 3.1 and 3.2 Human Identification Analysis, Tutorial,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041475.pdf .
- Applied Biosystems 2006a, AmpF ℓ STR[®] Identifiler[®] PCR Amplification Kit, User's Manual,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041201.pdf .
- Applied Biosystems 2006b, AmpF ℓ STR[®] Yfiler[™] PCR Amplification Kit, User's Manual,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041477.pdf .

Applied Biosystems 2007, StockMarks[®] Horse, Cattle, and Dog Genotyping Kits, Protocol,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_041413.pdf .

Applied Biosystems 2009a, AmpF_lSTR[®] Identifiler[®] Plus PCR Amplification Kit, User's Guide,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_072558.pdf .

Applied Biosystems 2009b, AmpF_lSTR[®] NGM[™] PCR Amplification Kit, User's Guide,
http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/applied_markets_support/documents/generaldocuments/cms_074250.pdf .

Promega Corporation, 2008a, PowerPlex[®] 16 System - Instructions for Use of Products DC6530 and DC6531, Technical Manual,
<http://www.promega.com/tbs/tmd012/tmd012.pdf> .

Promega Corporation, 2008b, PowerPlex[®] Y System - Instructions for Use of Products DC6760 and DC6761, Technical Manual,
<http://www.promega.com/tbs/tmd018/tmd018.pdf> .

Promega Corporation, 2009a, PowerPlex[®] ESX 17 System - Instructions for Use of Products DC6720 and DC6721, Technical Manual,
<http://www.promega.com/tbs/tmd024/tmd024.pdf> .

Promega Corporation, 2009b, PowerPlex[®] ESI 17 System - Instructions for Use Of Products DC6780 and DC6781, Technical Manual,
<http://www.promega.com/tbs/tmd028/tmd028.pdf> .

Internetové zdroje:

<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/>

http://www.accessexcellence.org/RC/AB/IE/Intro_The_Human_Genome.php

http://news.bbc.co.uk/2/hi/uk_news/england/london/8559319.stm

<http://www.appliedbiosystems.com/>

<http://www.softgenetics.com/GeneMarker.html/>

<http://www.fbi.gov/hq/lab/codis/clickmap.htm>